半蒴苣苔属植物染色体制片优化及染色体数目和倍性研究

高丹[1,2]，向小果[2]，张强[3]，张艳杰[1]，金伟涛[2*]

（1. 江西师范大学生命科学学院，南昌 330022；2. 江西省流域生态演变与生物多样性重点实验室，南昌大学生命科学研究院，南昌 330031；3. 广西喀斯特植物保育与恢复生态学重点实验室，广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所，广西 桂林， 541006）

摘要：染色体数目和倍性是系统与进化生物学和遗传学研究中十分重要的基础信息。苦苣苔科半蒴苣苔属（*Hemiboea*）植物具有重要的药用价值和观赏价值，约 44 种，主要分布于我国南部地区。因其根系细小且相互缠绕以及染色体小型的特点，获取其根尖材料进行染色体制片研究染色体往往比较困难。目前该属仅有 3 种的染色体数目被报道，绝大部分种的染色体数目和倍性尚不清楚。染色体数目的进化模式与物种的进化关系亦不清楚。为了探索该属染色体制片的适宜条件及染色体数目与物种的进化关系，本研究根据半蒴苣苔属植物具有叶片扦插繁殖的特性，采用叶片水培生根法来获取半蒴苣苔（*Hemiboea subcapitata*）、弄岗半蒴苣苔（*H. longgangensis*）、龙州半蒴苣苔（*H. longzhouensis*）、江西半蒴苣苔（*H. subacaulis* var. *jiangxiensis*）、华南半蒴苣苔（*H. follicularis*）和永福半蒴苣苔（*H. yongfuensis*）6 种植物的根尖材料，探索了不同实验条件对染色体制片效果的影响，对染色体制片实验的条件进行了优化并进行染色体计数，同时基于半蒴苣苔属染色体数目的进化历史探讨染色体数目的进化模式及其与物种进化的关系。结果表明：（1）上午 9:30-10:00 取材，解离 10 min 以及染色 15 min 为半蒴苣苔属染色体制片的适宜条件；（2）确定了半蒴苣苔属上述 6 种植物均为二倍体，染色体数目均为 32（2n=2x=32）；（3）除个别物种染色体数目有变化外，该属大部分物种染色体数目可能为 2n=2x=32，且染色体数目变化可能是非整倍化的作用，与物种进化没有明显关系。本研究为半蒴苣苔属以及具有类似叶片再生植株特性的类群的染色体制片提供了参考，并为该类群的分类，系统进化等方面的研究提供了启示。

关键词：苦苣苔科，半蒴苣苔属，叶片水培生根，染色体数目，基因组倍性

Optimization of chromosome preparation and chromosome numbers and ploidy in *Hemiboea*

GAO Dan[1,2], XIANG Xiaoguo[2], ZHANG Qiang[3], ZHANG Yanjie[1], JIN Weitao[2*]

(1. *College of Life Scienses*, *Jiangxi Normal University*, Nanchang 330022, China; 2. *Jiangxi Province Key Laboratory of Watershed Ecosystem Change and Biodiversity*, *Institute of Life Science*, *Nanchang University*, Nanchang 330031, China; 3. *Guangxi Key Laboratory of Plant Conservation and Restoration Ecology in Karst Terrain*, *Guangxi Institute of Botany*, *Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences*, Guilin 541006, Guangxi, China)

基金项目：国家自然科学基金（32060056），广西喀斯特植物保育与恢复生态学重点实验室项目（19-185-7）；广西自然科学基金项目（2020GXNSFAA297202）[Supported by the National Natural Science Foundation of China (32060056), and Guangxi Key Laboratory Construction Project（19-185-7）; Guangxi Natural Science Foundation (2020GXNSFAA297202)]。

第一作者：高丹（1997-），硕士，主要从事植物系统与进化研究，（E-mail）gaodan970915@163.com。

***通信作者：**金伟涛，博士，主要从事植物系统与进化研究，（E-mail）jin1234933@126.com。

Abstract: Chromosome numbers and genome ploidy are crucial basic information for evolutionary biology and genetics. *Hemiboea*, a genus of Gesneriaceae, with about 44 species, is mainly distributed in southern China, which have important medicinal and ornamental value. It is difficult to obtain suitable root tips for the chromosome preparation because of their small twining roots and small chromosomes. So far, only the chromosome numbers from three species of *Hemiboea* have been reported, while the chromosome numbers and ploidy of most species are unknown. The relationship between the pattern of chromosome number evolution and species evolution is also unclear. In this study, in order to explore the optimal conditions for chromosome preparation and the relationship between chromosome numbers and species evolution of *Hemiboea*, firstly, the root tips of six species (including *H. subcapitata*, *H. longgangensis*, *H. longzhouensis*, *H. subacaulis* var. *jiangxiensis*, *H. follicularis*, and *H. yongfuensis*), which were generated by the method of hydroponic rooting for cutting leaves based on the characteristics of leaf cuttage propagation of plants in the *Hemboea*, were used for the chromosome experiments. Then, we assessed the effects of different experimental conditions on chromosome preparation, and then, the conditions were optimized and the chromosome counting was performed. Finally, the evolutionary history of chromosome numbers in *Hemiboea* and the related genera including *Anna* and *Loxostigma* were traced based on the molecular phylogenetic relationships, and the evolutionary pattern of chromosome numbers and relationships with species evolution were studied. The results were as follows :(1) The optimal condition for karyotype preparation of the plants in *Hemiboea* are sampling during 9:30-10:00 am, dissociating for 10 min, and staining for 15 min. (2) All the six species of *Hemiboea* are diploid and with 32 chromosome numbers (2n=2x=32). (3) Except for a few species in the genus, the chromosome numbers of most species may be 2n=2x=32, and the variation of chromosome numbers may be caused by aneuploidy, which has no obvious relationship with the species evolution. This study shed light on chromosome preparation of *Hemiboea* and other groups with similar leaf regeneration characteristics, and provides implications for the classification and phylogeny of this group.

Key words: Gesneriaceae, *Hemiboea*, hydroponic rooting for cutting leaves, chromosome numbers, genome ploidy

染色体是生物遗传信息的载体，在植物的属间、种间、甚至种内常有不同程度的分化。这为探讨属间和种间的进化关系以及种内的变异格局提供了重要的依据，且被广泛用作为植物分类学的依据（洪德元，1990）。染色体的数目和倍性也是遗传学和基因组学研究的重要基础信息（Soltis & Soltis, 1999）。目前关于苦苣苔科植物细胞学的研究已有很多了。最早的报道来自于 Oehlkers（1923）对 *Monophyllaea horsfieldii* 的细胞学研究,自 20 世纪 60 年代起，苦苣苔科植物的细胞学研究工作开始大范围地开展起来（Ratter, 1963；Ratter & Ppentice, 1964；1967；1970）。中国的苦苣苔科植物的细胞学研究起步较晚，最早的是台湾学者对台湾半蒴苣苔（*Hemiboea bicornuta*）的研究（Hsu, 1968），在此之后苦苣苔科植物细胞学研究也取得了很多进展（鲁元学等，2002；曹丽敏等，2003；季慧等，2008；覃信梅等，2020），比如近年来广义报春苣苔属（*Primulina s. l.*）植物的细胞学就有了大量的研究，共约 100 种植物的染色体数目被报道（刘瑞瑞，2013）。综合这些研究发现，苦苣苔科植物染色体的体积通常比较小（Möller & Kiiehn, 2004），且该科植物染色体数目的变异范围比较大（李振宇和王印政，2005）。而大部分实验是选用植物的根尖作为实验材料（王印政和顾志建，1999；鲁元学等，2002；季慧等，2008），少数采用了花芽（Hsu, 1968）。选

择根尖为材料时，获取根尖的方式主要有种子萌发和组织培养，而这些方式都存在着一些不足。比如种子萌发时容易发霉，尽管萌发前已将种子进行了消毒，有些植物种子仍会发霉，已萌发的幼苗也会出现腐烂现象（赵大克等，2010）；植物组织培养的操作比较复杂，对实验环境和操作能力的要求比较高。因此，寻找一个更简便有效的获取根尖材料的方式对于苦苣苔科植物的细胞学研究十分有必要。

半蒴苣苔属（*Hemiboea*）为苦苣苔科（Gesneriaceae）植物，该属目前包括了约 44 种 6 变种，其中不少种类都具有重要的药用价值和观赏价值。该属广泛分布于中国南部，少数种类分布于越南北部和日本南部，中国南部喀斯特地区是其分布和分化中心（李振宇和王印政，2005）。目前关于半蒴苣苔属植物的细胞学研究很少，仅涉及台湾半蒴苣苔（*H. bicornuta*）、贵州半蒴苣苔（*H. cavaleriei*）和单座苣苔（*H. ovalifolia*）3 种，且这些研究仅限于染色体数目和倍性的报道（Hsu，1968；鲁元学等，2002；曹丽敏等，2003），然而染色体数目和倍性有何进化模式，与半蒴苣苔属物种进化之间有什么关系？由于该属植物核型研究困难，阻碍了这些问题的进一步研究。

比如 Hsu（1968）在研究台湾半蒴苣苔时选用了植物的花芽和根尖作为实验材料，且均不作预处理，仅报道了染色体二价体数目 n=18；鲁元学等（2002）在研究贵州半蒴苣苔时选用了植物的根尖作为实验材料，用 0.1%的秋水仙素进行预处理 2 h、用 1:1 的 1 mol·L^{-1} 盐酸和 45%冰醋酸混合液在 60 ℃水浴锅内进行解离 30 s，结果观察到染色体不够分散，有些染色体存在相互粘连的现象，这可能与其材料本身染色体为小型染色体以及实验过程中预处理时间不够、解离时间过短有关；曹丽敏等（2003）在研究单座苣苔时选用植物实生苗的根尖作为实验材料，用 2:1 的 1 mol·L^{-1} 盐酸和 45%冰醋酸混合液在 60 ℃水浴锅内进行解离 30 s，结果观察到染色体分散效果很差，染色体粘连现象十分明显，这可能与其材料本身染色体为小型染色体以及解离时间过短有关。因此，半蒴苣苔属小型染色体本身就难以分散且不易观察（李振宇和王印政，2005），解离时间过短又会使得细胞壁难以破开、染色体很难分散开、容易粘连在一起。半蒴苣苔属植物的染色体制片仍不容易。我们通过观察还发现半蒴苣苔属植物的根系十分细小且相互缠绕，很难直接得到良好的具有分生组织的根尖，通过植株直接获取根尖材料研究染色体数目的方法会比较困难。因此，该属的染色体数目研究有待于新的取材策略和制片方法的优化。

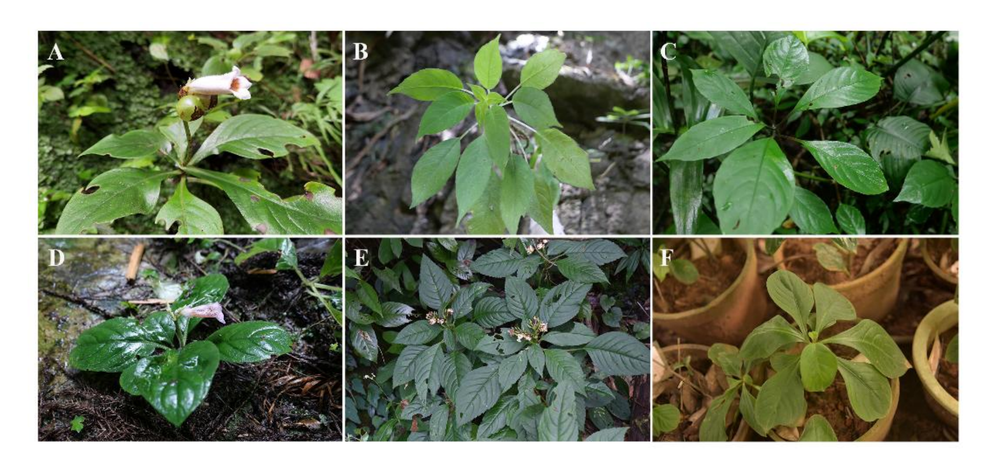
研究发现，苦苣苔科植物可以进行无性繁殖，只要很小的插穗就可以繁殖成新的植株，而在扦插繁殖方式中又属叶插最为常见，多数苦苣苔科植物都可用叶片进行叶插繁殖，且叶片还可以水插，只要将叶柄浸入清水中就可逐渐生根出芽（李振宇和王印政，2005）。在此前石山苣苔属的细胞学研究中已经成功的通过叶片水培生根（覃信梅等，2020），我们通过实验发现半蒴苣苔属植物也易通过叶片水培生根。这为我们开展半蒴苣苔属的细胞学研究提供了新的思路和方法。

因此本研究以半蒴苣苔属的半蒴苣苔（*H. subcapitata*）、弄岗半蒴苣苔（*H. longgangensis*）、龙州半蒴苣苔（*H. longzhouensis*）、江西半蒴苣苔（*H. subacaulis* var. *jiangxiensis*）、华南半蒴苣苔（*H. follicularis*）和永福半蒴苣苔（*H. yongfuensis*）这 6 种植物为研究对象，采用叶片水培生根的方法对半蒴苣苔属的 6 种植物进行细胞学研究，并通过在多种不同实验条件下对这 6 种半蒴苣苔属植物进行实验，（1）来探索该属染色体制片的适宜条件；（2）基于 6 种半蒴苣苔的染色体计数结果，结合已报道物种数据探讨该属染色体的变异情况；（3）结合分子系统学重建该属染色体数目的进化历史，探讨其进化模式与物种进化的关系。希望通过本研究的开展对半蒴苣苔属甚至具有类似叶片繁殖生物学特性类群的细胞学研究提供借鉴意义，为进一步研究该类群的分类、系统演化和物种形成等提供一些启示。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所涉及的研究材料见图 1，其来源见表 1。现栽培于南昌大学流域生态研究所系统与进化研究室温室内。凭证标本存放于南昌大学标本馆（JXU）。



A. 半蒴苣苔；**B.** 弄岗半蒴苣苔；**C.** 龙州半蒴苣苔；**D.** 江西半蒴苣苔；**E.** 华南半蒴苣苔；**F.** 永福半蒴苣苔。

A. *Hemiboea subcapitata*; **B.** *H. longgangensis*; **C.** *H. longzhouensis*; **D.** *H. subacaulis* var. *jiangxiensis*; **E.** *H. follicularis*; **F.** *H. yongfuensis*.

图 1 6 种半蒴苣苔属植物

Fig. 1 Six species of *Hemiboea*

表 1 材料来源及其染色体数目

Table 1 Sources of materials and chromosome numbers

序号 No.	种类 Species	采集地 Locality	凭证标本 Voucher	染色体数目(2n=2x) Chromosome No.
1	半蒴苣苔 *Hemiboea subcapitata*	江西婺源 Wuyuan, Jiangxi	向小果等 XXG et al.，2020806	32
2	弄岗半蒴苣苔 *H. longgangensis*	广西大新 Daxin, Guangxi	张丽果、严华、刘玉娟 ZLG, YH, LYJ，2021482	32
3	龙州半蒴苣苔 *H. longzhouensis*	广西大新 Daxin, Guangxi	张丽果、严华、刘玉娟 ZLG, YH, LYJ，2021449	32
4	江西半蒴苣苔 *H. subacaulis* var. *jiangxiensis*	江西井冈山 Jingangshan, Jiangxi	向小果等 XXG et al.，2020277	32
5	华南半蒴苣苔 *H. follicularis*	广西贺州 Hezhou, Guangxi	张丽果、严华、刘玉娟 ZLG, YH, LYJ，2021594	32
6	永福半蒴苣苔 *H. yongfuensis*	广西植物研究所 Guangxi Institute of Botany	张强 ZQ，2021920	32

1.2 方法

1.2.1 半蒴苣苔属植物染色体制片优化

1.2.1.1 取材

从 6 种半蒴苣苔属植物上选取生长状态良好的叶片，在室温下用清水培养 10~20 d 左右，2~3 d 换一次水，待叶片生根，选取生长良好的根尖进行取材，在上午 9:30-10:00,

10:00-10:30 以及 10:30-11:00 三个时间段进行取样。

1. 2. 1. 2 预处理

将根尖材料浸入 0.002 mol·L $^{-1}$ 的 8-羟基喹啉溶液中，以溶液浸没根尖为度，在室温下预处理 4~5 h。

1. 2. 1. 3 固定

将处理后的根尖材料用纯水冲洗两次，再转入卡诺固定液（无水乙醇：冰醋酸=3:1）中，在 4 ℃下固定 30 min。

1. 2. 1. 4 解离

将固定后的根尖材料用无水乙醇洗 2 次，再用纯水冲洗，然后转入 1 mol·L $^{-1}$ HCL 中，在 60 ℃恒温金属浴锅中分别解离 8、10、12 min。

1. 2. 1. 5 染色

将解离后的根尖材料用纯水洗 2 次，每次 5 分钟。最后将根尖置于载玻片中间，用刀片从前端乳白色的分生区组织中切取尽可能薄的一片，滴加少量改良苯酚品红染液，分别染色 10 min 和 15 min。

1. 2. 1. 6 压片

对染色过后的材料进行常规压片，压片时用带橡皮头的铅笔垂直敲打，注意不要滑动盖玻片，使染色体分散效果更好。

1. 2. 1. 7 镜检及染色体计数

将制作好的玻片在 Leica DM2500 显微镜下进行检测，挑选染色体分散效果好的有丝分裂中期分裂相细胞，在 100 倍油镜下进行观察和拍照。染色体计数方法参照李懋学和陈瑞阳（1985）的植物核型分析标准。

1. 2. 2 半蒴苣苔属染色体数目祖先状态重建

为了探讨半蒴苣苔属植染色体数目的进化历史，本研究以半蒴苣苔属 28 种及其近缘的吊石苣苔属（*Lysionotus*）13 种和大苞苣苔属（*Anna*）3 种植物为内类群，以来自紫花苣苔属（*Loxostigma*）的两种为外类群，基于下载自 NCBI 的核糖体 ITS 和 3 个叶绿体基因包括 *rbcL*、*matK* 和 *trnL-F*（表 2），使用 MAFFT v7. 407（Katoh & Standley, 2013）分别进行矩阵排列，利用 FASconCAT-G v1. 04（Kück & Longo, 2014）将所有基因矩阵进行串联，通过 RAxML v. 8. 2. 12（Stamatakis, 2014）构建最大似然（maximum likelihood，ML）树，碱基替代模型为 GTRGAMMA，经过 1 000 次 bootstraps 重复抽样估算支持率。

本研究染色体二价体究通过 WebCyte 数据库（http://elmer.rbge.org.uk/webcyte/webcyteintro.php）和 CCDB 数据库（Chromosome Counts Database，http://ccdb.tau.ac.il/browse/）对半蒴苣苔属及其近缘的吊石苣苔属、大苞苣苔属物种的染色体数目数据进行收集。其中台湾半蒴苣苔仅报道数目 n=18，其二倍体染色体数目尚不清楚，此处暂以 2n=36 作为其染色体数目进行分析。对于尚未报道染色体数目的物种在性状编码时以缺失处理。在此基础上，结合本研究的 6 种半蒴苣苔属植物的染色体数据，基于上述系统发育树，通过 RASP v. 4. 2（Yu et al., 2020）软件，采用 Bayesian Binary MCMC（BBM）的方法进行染色体数目的祖先状态重建，探究其可能的进化历史。

表 2 半蒴苣苔属分子系统学取样表

Table 2 Samples of *Hemiboea* in phylogenetic analysis

物种 Species	染色体数目 Chromosome No.	序列片段 ITS	*matK*	*rbcL*	*trnL-F*
软叶大苞苣苔 *Anna mollifolia*	34	KJ475421	OK322623	OK322596	FJ501543
白花大苞苣苔 *A. ophiorrhizoides*		MK747107	OK322624	OK322597	MK746233

大苞苣苔 *A. submontana*	34	KM063146	MN367401	MN367399	FJ501542
白花半蒴苣苔 *Hemiboea albiflora*		MN334629	MN367403	MN367386	—
台湾半蒴苣苔 *H. bicornuta*	36	KY288050	—	—	FJ501534
贵州半蒴苣苔 *H. cavaleriei*	32	KJ475419	MN367405	MN367382	FJ501533
水晶半蒴苣苔 *H. crystallina*		MN334632	MN367407	MN367388	—
齿叶半蒴苣苔 *H. fangii*		MN334633	MN367408	MN367372	HQ632882
毛果半蒴苣苔 *H. flaccida*		MN334634	MN367409	MN367381	JF697579
华南半蒴苣苔 *H. follicularis*	32	KY288047	MN367410	—	HQ632885
纤细半蒴苣苔 *H. gracilis*		MN334635	MN367411	MN367375	FJ501536
广东半蒴苣苔 *H. guangdongensis*		MF625025	MN367436	MN367398	—
H. henryi		MT644723	—	—	KM232650
宽萼半蒴苣苔 *H. latisepala*		MN334636	MN367413	—	—
弄岗半蒴苣苔 *H. longgangensis*	32	MN334637	MN367414	OK322601	HQ632889
龙州半蒴苣苔 *H. longzhouensis*	32	KY288043	MN367415	MN367371	HQ632888
大苞半蒴苣苔 *H. magnibracteata*		MN334628	MN367402	OK322602	HQ632887
麻栗坡半蒴苣苔 *H. malipoensis*		MN334639	MN367416	OK322603	KJ948111
柔毛半蒴苣苔 *H. mollifolia*		MN334640	MN367417	MN367373	—
峨眉半蒴苣苔 *H. omeiensis*		KY288025	MN367418	OK322604	HQ632886
单座苣苔 *H. ovalifolia*	24	KY288040	OK322630	KX527264	HQ632883
拟大苞半蒴苣苔 *H. pseudomagnibracteata*		KY288035	—	—	—
H. pterocaulis		MN334643	MN367420	MN367390	KY607416
紫花半蒴苣苔 *H. purpurea*		MN334644	MN367421	OK322605	—
H. purpureotincta		KY288037	MN367422	MN367374	HQ632884
红苞半蒴苣苔 *H. rubribracteata*		MN334646	MN367423	OK322606	HQ632890
腺毛半蒴苣苔 *H. strigosa*		MN334647	MN367424	—	—
短茎半蒴苣苔 *H. subacaulis*	32	MN334658	MN367437	MN367380	—
半蒴苣苔 *H. subcapitata*	32	MN334657	MN367435	MN367397	KY607420
绥阳半蒴苣苔 *H. suiyangensis*		MN334659	MN367438	MN367377	—
王氏半蒴苣苔 *H. wangiana*		KY288046	—	—	KM232651
桂黔吊石苣苔 *Lysionotus aeschynanthoides*		MW507480	OK322634	OK322608	MW523021
攀缘吊石苣苔 *L. chingii*		FJ501332	OK322635	OK322609	FJ501498
凤山吊石苣苔 *L. fengshanensis*		MW507484	KJ137896	—	MW523017
滇西吊石苣苔		AF349152	—	—	FJ501495

L. forrestii					
异叶吊石苣苔 *L. heterophyllus*		MW507483	—	—	MW523022
长梗吊石苣苔 *L. longipedunculatus*		KY288028	OK322637	OK322612	MW523013
小叶吊石苣苔 *L. microphyllus*		MN334660	MN367439	MN367400	—
吊石苣苔 *L. pauciflorus*	30	KY288027	MN311830	MN204948	MK746232
细萼吊石苣苔 *L. petelotii*		HQ632974	—	—	FJ501496
毛枝吊石苣苔 *L. pubescens*		—	—	—	MW523015
桑植吊石苣苔 *L. sangzhiensis*		KJ475422	—	—	—
齿叶吊石苣苔 *L. serratus*	32	OL537422	OK322638	OK322613	MW523018
川西吊石苣苔 *L. wilsonii*		MW507482	OK322640	OK322615	—
Outgroup					
齿萼斜柱苣苔 *Loxostigma fimbrisepalum*		KU985104	—	—	FJ501507
斜柱苣苔 *L. griffithii*	34	MN843194	OK322633	KX527352	FJ501508

2 结果与分析

2. 1 半蒴苣苔属植物染色体制片优化

2. 1. 1 取样方法的优化

通过实验发现，半蒴苣苔、弄岗半蒴苣苔、龙州半蒴苣苔、江西半蒴苣苔、华南半蒴苣苔和永福半蒴苣苔 6 种植物通过叶片水培生根的方法得到了生长状态良好的根，通过此方法得到的根比土生的根要更粗壮、更易取材且染色体更易被压散（图 2，图 3）。

2. 1. 2 取样时间的优化

比较不同取样时间下染色体的制片效果，结果如表 3 和图 4 所示。发现在上午 9:30-10:00 取材时，根尖细胞分裂旺盛且染色体分散效果良好；在上午 10:00-10:30 取材时，染色体分散效果不如上午 9:30-10:00；在上午 10:30-11:00 取材时，观察到的分裂相不多且分裂效果不好。

2. 1. 3 解离时间的优化

比较不同解离时间下染色体的制片效果，结果如表 3 和图 4 所示。发现在解离时间为 8 min 时，观察到的染色体不够分散，出现粘连现象，计数时困难较大；解离时间为 10 min 时，染色体分散效果良好，便于计数；解离时间为 12 min 时，时间过长有些染色体出现断裂，影响计数的准确性。

2. 1. 4 染色时间的优化

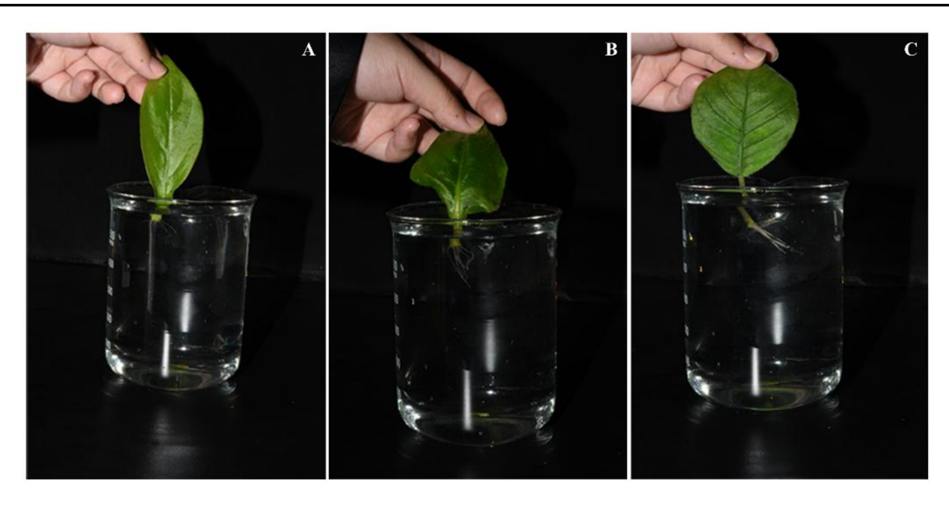
比较不同染色时间下染色体的制片效果，结果如表 3 和图 4 所示。发现在染色时间为 10 min 时，染色体着色效果较差，不利于观察；染色时间为 15 min 时，染色体着色效果良好，观察时很清晰；染色时间为 20 min 时，染色体着色效果与 15 min 时差别不大，但由于时间过长，观察时发现容易出现染液变干、有颗粒物的现象，影响观察视野和染色体计数。

表 3 不同处理对染色体制片效果的影响

Table 3 Effects of different treatments on chromosome preparation

制片环节	处理	染色体制片效果

Production part	Treatment	Chromosome preparation effect
取样时间 Sampling time	9:30-10:00 am	分裂相多，染色体分散良好 Many mitotic phases and well dispersed chromosomes
	10:00-10:30 am	分裂相多，染色体部分聚集 Many mitotic phases and chromosomes part partial aggregation
	10:30-11:00 am	分裂相少，染色体聚集 Less mitotic phases and chromosomes aggregation
解离时间 Dissociation time	8 min	细胞未完全分散，染色体聚集 Cells are not completely dispersed and chromosomes aggregation
	10 min	细胞分散，染色体分散良好 Cells scattered and well dispersed chromosomes
	12 min	细胞容易分散，染色体出现断裂 Cells dispersed easily and chromosomes broke down
染色时间 Dyeing time	10 min	染色体染色浅 Chromosomes are stained shallowly
	15 min	染色体染色较深 Chromosomes are stained deeply
	20 min	染色剂出现颗粒物沉淀 Particle sedimentation occurs in the staining solution

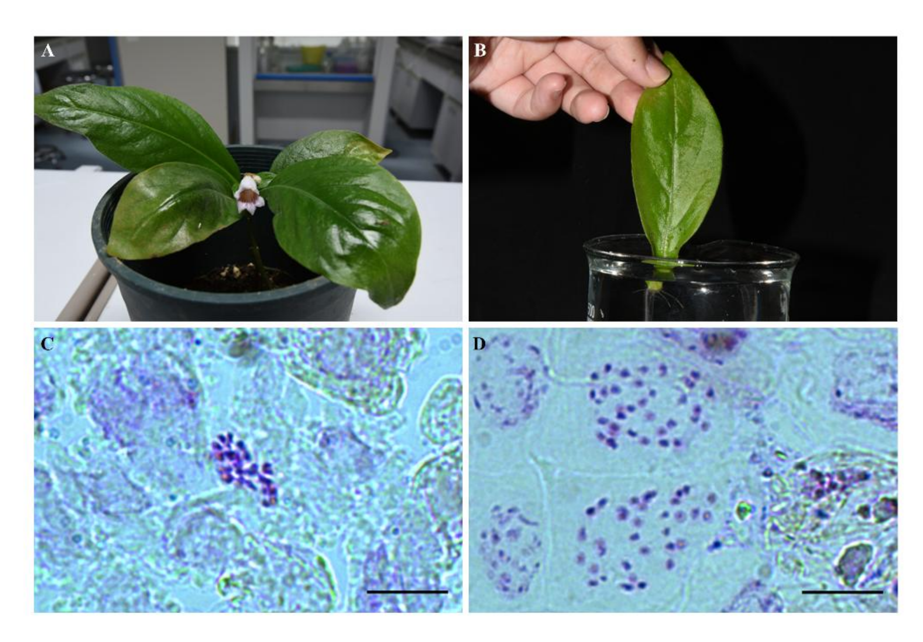


A. 半蒴苣苔；**B.** 江西半蒴苣苔；**C.** 弄岗半蒴苣苔。

A. *Hemiboea subcapitata*; **B.** *H. subacaulis* var. *jiangxiensis*; **C.** *H. longgangensis*.

图 2 半蒴苣苔属植物通过水培方式生长的根

Fig. 2 Roots of *Hemiboea* grown by hydroponics

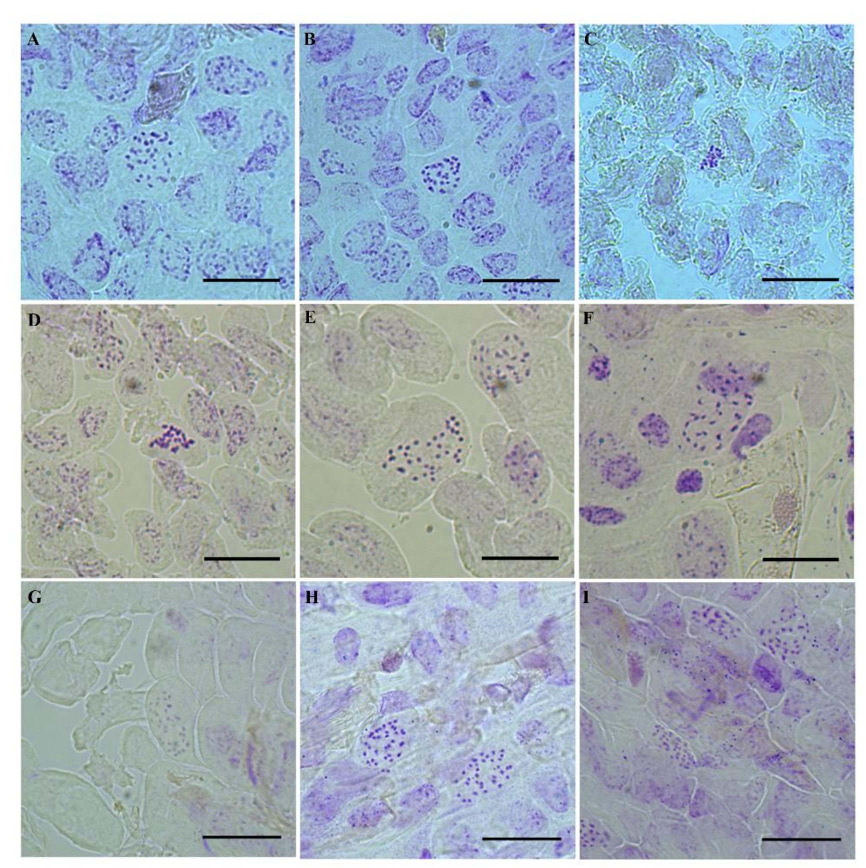


A, C. 土壤培养；**B, D.** 清水培养。Bar=10 μm。

A, C. Soil culture; **B, D.** Hydroponic culture. Bar=10 μm.

图 3 不同培育方式生长的根对染色体制片效果的影响

Fig. 3 Effects of roots grown by different cultivation methods on chromosome preparation



A. 上午 9:30-10:00 取材；**B.** 上午 10:00-10:30 取材；**C.** 上午 10:30-11:00 取材；**D.** 解离 8 min；**E.** 解离 10 min；**F.** 解离 12 min；**G.** 染色 10 min；**H.** 染色 15 min；**I.** 染色 20 min。Bar=10 μm。

A. Take materials from 9:30-10:00 am; **B.** Take materials from 10:00-10:30 am; **C.** Take materials from 10:30-11:00 am; **D.** Dissociate for 8 minutes; **E.** Dissociate for 10 minutes; **F.** Dissociate for 12 minutes; **G.** Dyeing for 10

minutes; **H.** Dyeing for 15 minutes; **I.** Dyeing for 20 minutes. Bar=10 μm.

图 4 不同处理下的染色体制片效果

Fig. 4 Chromosome preparation effect of different treatments

2. 2 半蒴苣苔属植物染色体数目

通过实验观察得到，该 6 种半蒴苣苔属植物的染色体数目均为 2n=2x=32（图 5）。

2. 2. 1 半蒴苣苔 *Hemiboea subcapitata*

本种分布于中国的华中、华南以及越南北部地区（李佳慧等，2020），生长在山坡沟边、岩石山或林荫下，海拔高度为 500~1 500 m（邱保林等，2014）。体细胞中期染色体数目为 2n=32（图 5：A,B）。

2. 2. 2 弄岗半蒴苣苔 *H. longgangensis*

本种分布于广西的龙州、大新、桂林、隆安等地，生长在石灰岩石山谷密林下阴处，海拔高度约为 130~400 m。体细胞中期染色体数目为 2n=32（图 5：C,D）。

2. 2. 3 龙州半蒴苣苔 *H. longzhouensis*

本种分布于广西的龙州、桂林、宁明、隆安等地，生长于石灰岩石山山坡密林处，海拔高度约为 170~800 m。体细胞中期染色体数目为 2n=32（图 5：E,F）。

2. 2. 4 江西半蒴苣苔 *H. subacaulis* var. *jiangxiensis*

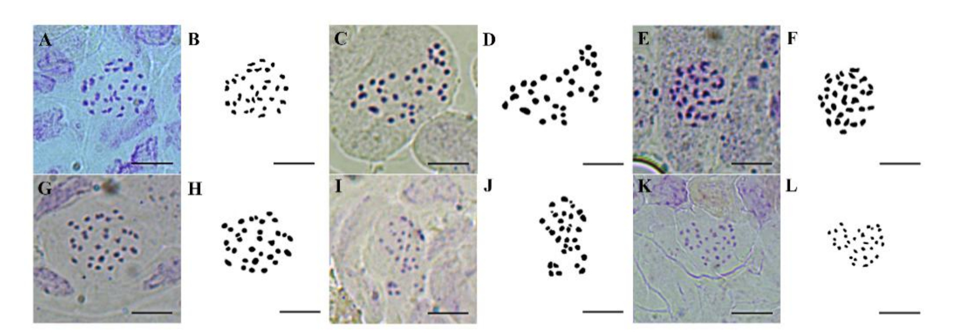
本种分布于江西的遂川、南康、井冈山、上犹、赣州等地，生长在山谷阴湿石面，海拔高度为 750~900 m（李振宇和王印政，2005）。体细胞中期染色体数目为 2n=32（图 5：G,H）。

2. 2. 5 华南半蒴苣苔 *H. follicularis*

本种分布于广东北部、广西和贵州，生长在石灰岩山地林下阴湿石上或沟边石缝中，海拔高度约为 240~1 500 m（李振宇和王印政，2005）。体细胞中期染色体数目为 2n=32（图 5：I,J）。

2. 2. 6 永福半蒴苣苔 *H. yongfuensis*

本种分布于广西省桂林市永福县金钟山，生长在喀斯特山石灰岩基质上（李佳慧等，2020）。体细胞中期染色体数目为 2n=32（图 5：K,L）。



A, B. 半蒴苣苔；**C, D.** 弄岗半蒴苣苔；**E, F.** 龙州半蒴苣苔；**G, H.** 江西半蒴苣苔；**I, J.** 华南半蒴苣苔；**K, L.** 永福半蒴苣苔。2n=32, Bar=10 μm。

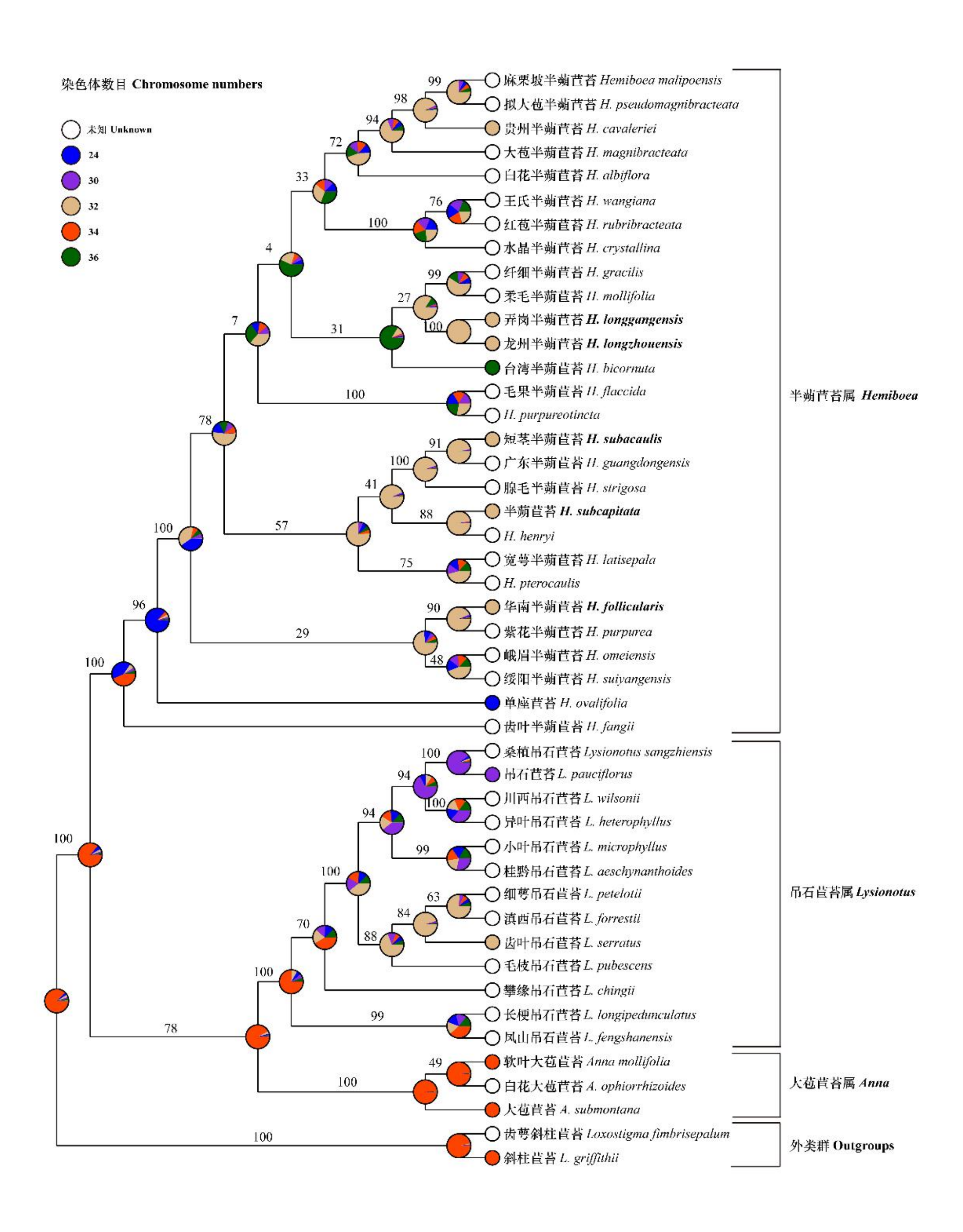
A, B. *Hemiboea subcapitata*; **C, D.** *H. longgangensis*; **E, F.** *H. longzhouensis*; **G, H.** *H. subacaulis* var. *jiangxiensis*; **I, J.** *H. follicularis*; **K, L.** *H. yongfuensis*. 2n=32, Bar=10 μm.

图 5 半蒴苣苔属 6 种植物的染色体数目

Fig. 5 Chromosome numbers of the six species of *Hemiboea*

2. 3 半蒴苣苔属染色体数目和倍性的进化

根据半蒴苣苔属及近缘的吊石苣苔属（*Lysionotus*）、大苞苣苔属（*Anna*）祖先状态重建结果，三个近缘属共有祖先的染色体数目可能是 2n=34。其中大苞苣苔属为 2n=34，吊石苣苔属可能从 2n=34 向 2n=32，再向 2n=30 减少方向进化，而在半蒴苣苔属，染色体数目可能从祖先的 2n=34 到 2n=24，32，36 进化，其中 2n=32 出现了多次。半蒴苣苔属及其近缘属均为二倍体，尚无多倍化的现象（杨丽华等，2019）。



分支上的数字表示自展支持率。节点上的饼图表示所有可能的染色体数目范围的相对比例。黑体部分为本研究新报道的染色体数目的物种。

The numbers attached to the branches show the bootstrap supports. Pie charts at the nodes indicate relative probabilities of all possible choromosome number ranges. The species in bold are newly reported chromosome numbers in this study.

图 6 基于半蒴苣苔属及近缘类群的 4 个基因联合矩阵（ITS、*matK*、*rbcL*、*trnL-F*）的

染色体数目祖先性状重建

Fig. 6 Ancestral state reconstruction of chromosome number in *Hemiboea* and related genera based on four concatenated genes (ITS, *matK*, *rbcL*, *trnL-F*)

3 讨论与结论

3. 1 半蒴苣苔属植物染色体制片优化

半蒴苣苔属植物由于根系十分细小且相互缠绕，从植株直接获取根尖比较困难。此外，该属植物染色体小型，其根尖分生组织压片后染色体不易分散且难以观察到清晰的染色体形态，这也使得该属细胞学研究较少。因此，本研究对该属染色体制片的取材方法、取材时间、解离时间及染色时间等条件进行了优化。

实验材料是实验最重要的部分，取材越方便，根尖材料越健康，后续实验的开展成功的几率就越高。目前已有一些植物使用过水培方法进行生根，如萱草、大蒜、洋葱等，而在苦苣苔科里，仅在石山苣苔属的研究中有报道（田秋元和杨约田，2009；李国泰，2017；李永平等，2020；覃信梅等，2020）。本研究通过叶片水培生根的方法获取了生长状态良好的根尖材料（图 2），且我们对水培生根方法进行了优化，只需要在室温下，将半蒴苣苔属植物健康叶片的叶柄插入清水中即可成功生根。这可能与苦苣苔科植物易于通过叶片扦插繁殖的生物学特性有关（李振宇和王印政，2005），本实验的方法与以往的相比操作更加简单方便。通过实验我们还发现在水培方式下长出的根比土生的根要更粗壮、染色体更易被压散（图 2，图 3），良好的根尖材料为实验奠定了坚实的基础。

为了获得较多的细胞有丝分裂中期分裂相，就需要在植物有丝分裂旺盛的时期进行取样。研究表明，大多数植物在上午 8:00-11:00 取材，较容易获得中期分裂相，但不同类群取样的最佳时间段也会有所不同（韩毅科等，2003；杨宁等，2012；赵雁等，2019；覃信梅等，2020）。本研究中，6 种半蒴苣苔属植物最佳的取样时间段为上午 9:30-10:00（图 3：A），这与大多数植物常规取材时间一致。

解离的时间对最终染色体的制片效果影响非常大，解离时间过短，细胞壁很难破开，时间太过则容易造成染色体断裂或缺失。以往苦苣苔科植物染色体制片中解离时间大部分为 30 s（王印政和顾志建，1999；鲁元学等，2002；曹丽敏等，2003；季慧等，2008），少数如报春苣苔为 3 min、石山苣苔为 3~4 min（刘瑞瑞等，2014；覃信梅等，2020）。但在本研究中，半蒴苣苔属植物解离时间为 10 min 时染色体分散效果最佳（表 3，图 4：E），这与具有体细胞小，染色体数目多的金盏菊最佳解离时间为 9~10 min 一致（龙海海等，2020），但与本属的贵州半蒴苣苔（鲁元学等，2002）和单座苣苔（曹丽敏等，2003）两种解离 30 s 不同，而本研究的分散效果更佳（图 5）。

以往的半蒴苣苔属植物染色体制片对染色时间的描述较少（鲁元学等，2002；曹丽敏等，2003），但染色时间对于染色体制片也起到了一定的影响。染色时间过短，染色体的着色浅，难以观察（图 4：G）；染色时间过长，染色剂容易出现颗粒物沉淀沾在玻片上，难以计数（图 4：I）。根据我们结果，发现半蒴苣苔属该 6 种植物染色时间为 15 min 时，染色体着色效果最好（图 4：H，图 5：A-L），这与金盏菊染色 8~12 min 效果最好比较接近（龙海海等，2020）。

综上所述，不同类群染色体制片的方法可能不同，需要结合类群本身特性并多次尝试

才可能得到最佳的染色体制片方案。本研究主要通过叶片水培生根法对半蒴苣苔属6种植物进行取材，此法有效的解决了半蒴苣苔属植物染色体制片中取材困难的问题。在此基础上，通过优化取样、解离、染色时间等条件进行染色体制片，确定了该属该6种植物的染色体数目，这为半蒴苣苔属、苦苣苔科甚至具有类似生物学特性类群的染色体制片提供了借鉴。

3.2 半蒴苣苔属染色体数目和倍性

在半蒴苣苔属中，台湾半蒴苣苔（*H. bicornuta*）与本研究中的弄岗半蒴苣苔（*H. longgangensis*）和龙州半蒴苣苔（*H. longzhouensis*）所在支系聚为一支，该物种最早基于花芽进行的染色体研究，表明其染色体二价体数目为n=18（Hsu, 1968），该物种染色体数目可能为2n=2x=36，然确切数目尚不清楚，需要进一步研究，而后两种均为2n=2x=32。Weber等（2011）根据分子系统学的研究，将单座苣苔属（*Metabriggsia*）包括单座苣苔（*H. ovalifolia*）和紫叶单座苣苔（*H. purpureotincta*）合并到半蒴苣苔属，这与本研究中的分子系统学结果一致（图6），根据我们的研究，其中位于半蒴苣苔属基部的单座苣苔是该属已知染色体数目最少的物种（2n=2x=24）（曹丽敏等，2003），另外的紫叶单座苣苔与单座苣苔关系较远，且与毛果半蒴苣苔（*H. flaccida*）互为姐妹，其染色体数目尚无报道。贵州半蒴苣苔（*H. cavaleriei*）（鲁元学等，2002）与本研究中分布于各个支系的半蒴苣苔（*H. subcapitata*）、弄岗半蒴苣苔（*H. longgangensis*）、龙州半蒴苣苔（*H. longzhouensis*）、江西半蒴苣苔（*H. subacaulis* var. *jiangxiensis*）、华南半蒴苣苔（*H. follicularis*）和永福半蒴苣苔（*H. yongfuensis*）6种植物的染色体数目和倍性一致，均为二倍体（2n=2x=32）（图5，6）。

综上所述，目前半蒴苣苔属染色体数目和倍性的变异范围与以往的研究一致（杨丽华等2019），为2n=2x=24, 32，其中n=18的台湾半蒴苣苔染色体数目可能需要进一步确认。此外，基于系统发育和染色体数目结合的研究表明，该属染色体数目变化与物种进化并没有明显的变化趋势（图6），除个别物种染色体数目有变异外，该属物种染色体数目相对稳定，且大部分可能是2n=2x=32。由于该属已有物种的染色体研究较少，确切的染色体变异范围还有待于其余物种进一步的细胞学研究。

3.3 半蒴苣苔属染色体数目的进化模式

在植物进化过程中，染色体数目非整倍化非常普遍，且对植物进化和物种形成具有重要意义（De Storme & Mason, 2014）。这种非整倍化往往由于染色体裂变或融合导致染色体数目非整倍性的增加或减少，但这种染色体数目的非整倍性变化不涉及遗传信息的增加或丢失（De Storme & Mason, 2014）。根据半蒴苣苔属及其近缘类群染色体数目祖先性状重建的结果（图6），表明半蒴苣苔属及近缘的吊石苣苔属和大苞苣苔属的共同祖先可能是由2n=34进化而来，其中大苞苣苔属保持祖先染色体数目状态（2n=34），吊石苣苔属可能是由2n=34向2n=32，30逐渐减少。半蒴苣苔属可能由2n=34向2n=24，32，36变化，由于该属部分支系支持率不高，染色体变化趋势并不明显，其中2n=32多次平行出现。半蒴苣苔属以及近缘的吊石苣苔属染色体数目的变化可能与非整倍化进化有关，这也与苦苣苔科许多类群如汉克苣苔属和长蒴苣苔属等染色体非整倍化进化模式类似（杨丽华等，2019）。目前由于半蒴苣苔属及其近缘属染色体的研究较少，且尚无高分辨率的种间系统发育关系，需要进一步开展更多物种的细胞学与分子系统学结合的研究才能进一步揭示其染色体的进化模式。

参考文献：

CAO LM, CAO M, TANG XL, et al., 2003. Chromosome numbers of 4 species in the Gesneriaceae from Guangxi[J]. Guihaia, 23(4): 331-333. [曹丽敏，曹明，唐咸来，等，2003. 广西苦苣苔科四种植物的染色体数目报道[J]. 广西植物，23(4)：331-333.]

DE STORME N, MASON A, 2014. Plant speciation through chromosome instability and ploidy change: cellular mechanisms, molecular factors and evolutionary relevance[J]. Curr Plant Biol, 1: 10-33.

HAN YK, DU SL, WANG M, 2003. Study on chromosome preparing and ploidy in cucumber[J]. Acta Agric Boreali--Sin, 18(1): 72-74. [韩毅科，杜胜利，王鸣，2003. 黄瓜染色体制片及倍性研究[J]. 华北农学报，18(1)：72-74.]

HONG DY, 1990. Plant cell taxonomy[M]. Beijing: Science Publishing House: ⅰ-ⅱ. [洪德元，1990.植物细胞分类学[M].北京：科学出版社：ⅰ-ⅱ.]

HSU CC, 1968. Preliminary chromosome studies on the vascular plants of Taiwan (Ⅱ)[J]. Taiwania, 14(1): 11-27.

JI H, GUAN KY, LU YX, 2008. Chromosome numbers of eight species in the genus *Petrocosmea* (Gesneriaceae)[J]. Acta Bot Yunnanica, 30(3): 321-324. [季慧，管开云，鲁元学，2008. 石蝴蝶属八种植物的染色体数目报道[J]. 云南植物研究，30(3)：321-324.]

KATOH K, STANDLEY DM, 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability[J]. Mol Biol Evol, 30(4): 772-780.

KÜCK P, LONGO GC, 2014. FASconCAT-G: extensive functions for multiple sequence alignment preparations concerning phylogenetic studies[J]. Front Zool, 11(1): 81.

LI GT, 2017. The Liliaceae four plant chromosome karyotype analysis[J]. Forest By-Prod Speciality China, 6(5): 21-25. [李国泰，2017.百合科 4 种植物染色体的核型比较[J]. 中国林副特产，6(5)：21-25.]

LI JH, HUANG ZP, LU YB, et al., 2020. Diversity, geographical distribution and species boundary of the *Hemiboea subcapitata* complex[J]. Guihaia, 40(10): 1477-1490. [李佳慧，黄章平，卢永彬，等，2020. 半蒴苣苔复合群的多样性、地理分布和物种界限[J]. 广西植物，40(10)：1477-1490.]

LI MX, CHEN RY, 1985. A suggestion on the standardization of karyotype analysis in plants[J]. J Wuhan Bot Res, 3(4): 297-302. [李懋学，陈瑞阳，1985. 关于植物核型分析的标准化问题[J]. 武汉植物学研究，3(4)：297-302.]

LIU RR, 2013. Cytological characteristics and systematic significance in *Primulina sensu lato* (Gesneriaceae)[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences. [刘瑞瑞，2013.广义报春苣苔属（苦苣苔科）的细胞学特征及其系统学意义[D].北京：中国科学院大学.]

LIU RR, SKOG LE, LIAO JP, et al., 2014. New chromosome counts and their taxonomic implications in *Primulina sensu lato* (Gesneriaceae)[J]. Plant Divers Resour, 36(1): 13-21. [刘瑞瑞，SKOG LE，廖景平，等，2014. 广义报春苣苔属（苦苣苔科）的染色体新计数及其分类学意义[J]. 植物分类与资源学报，36(1)：13-21.]

LI YP, JIA ML, LIANG Z, et al., 2020. Karyotype analysis of three species of *Hemerocallis*[J]. J Shanxi Agric Sci, 48(1): 32-34, 86. [李永平，贾民隆，梁峥，等，2020. 3 种萱草属植物染色体核型分析[J]. 山西农业科学，48(1)：32-34，86.]

LI ZY, WANG YZ, 2005. Plants of Gesneriaceae in China[M]. Zhengzhou: Henan Science and Technology Publishing House: 123, 576, 653-654. [李振宇，王印政，2005. 中国苦苣苔科植物[M]. 郑州：河南科学技术出版社：123，576，653-654.]

LONG HH, ZHANG NQ, LI ZY, et al., 2020. Study on chromosome technique of *Calendula officinalis* and its karyotype[J]. Acta Agric Zhejiangensis, 32(1): 86-92. [龙海梅，张楠卿，李宗艳，等，2020. 金盏菊根尖细胞染色体制片与核型分析[J]. 浙江农业学报，32(1)：86-92.]

LU YX, SUN XF, ZHOU QX, et al., 2002. Chromosome numbers in ten species in the Gesneriaceae from Yunnan[J]. Acta Bot Yunnanica, 24(3): 377-382. [鲁元学，孙先凤，周其兴，等，2002. 云南十种苦苣苔科植物的染色体数目报道[J]. 云南植物研究，24(3)：377-382.]

MÖÖLLER M, KIEHN M, 2004. A synopsis of cytological studies in Gesneriaceae[J]. Edinb J Bot, 60(3): 425-447.

OEHLKERS F, 1923. Entwicklungsgeschichte von *Monophyllaea horsfieldii*[J]. Beih Bot Centralbl, 39(16): 128-151.

QIN XM, PAN B, LU YB, et al., 2020. Chromosome numbers and ploidy of four species (including one variety) in *Petrocodon* Hance[J]. Guihaia, 40(10): 1466-1476. [覃信梅，盘波，卢永彬，等，2020. 石山苣苔属四种（含一变种）植物的染色体数目和倍性研究[J]. 广西植物，40(10)：1466-1476.]

QIU BL, XV LX, WEI XY, et al., 2014. Anthraquinones from *Hemiboea subcapitata*[J]. J Trop Subtrop Bot, 22(5): 507-510. [邱保林，徐良雄，魏孝义，等，2014. 降龙草的蒽醌类化学成分[J]. 热带亚热带植物学报，22(5)：507-510.]

RATTER JA, 1963. Some chromosome numbers in the Gesneriaceae[J]. Notes Roy Bot Gard Edinb, 24(1): 221-229.

RATTER JA, PPENTICE HT, 1964. Chromosome numbers in the Gesneriaceae: Ⅱ[J]. Notes Roy Bot Gard Edinb, 25(3): 303-307.

RATTER JA, PPENTICE HT, 1967. Chromosome numbers in the Gesneriaceae: Ⅲ[J]. Notes Roy Bot Gard Edinb, 27(2): 205-209.

RATTER JA, PPENTICE HT, 1970. Chromosome numbers in the Gesneriaceae: Ⅳ[J]. Notes Roy Bot Gard Edinb, 30(1): 183-187.

SOLTIS DE, SOLTIS PS, 1999. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution[J]. Trends Ecol Evol, 14(9): 348-352.

STAMATAKIS A, 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies[J]. Bioinformatics, 30(9): 1312-1313.

TIAN QY, YANG YT, 2009. Karyotype analysis on Onion and discussion on its related dialysis methods[J]. J Anhui Agric Sci, 37(25): 12341-12343. [田秋元，杨约田，2009.洋葱核型分析及有关制片方法的探讨[J].安徽农业科学，37(25)：12341-12343.]

WANG YZ, GU ZJ, 1999. Karyomorphology of four species in *Ancylostemon*, *Briggsiopsis* and *Lysionotus* (Gesneriaceae)[J]. Acta Phytotax Sin, 37(2): 137-142. [王印政，顾志建，1999.直瓣苣苔属、筒花苣苔属和吊石苣苔属 4 个种的核形态学研究[J].植物分类学报，37(2)：137-142.]

WEBER A, WEI YG, SONTAG S, et al., 2011. Inclusion of *Metabriggsia* into *Hemiboea* (Gesneriaceae)[J]. Phytotaxa, 23(1): 37-48.

YANG LH, FENG C, XU MZ, et al., 2019. Synopsis of cytological studies on Didymocarpoideae (Gesneriaceae) under new classification system[J]. J Trop Subtrop Bot, 27(5): 548-557. [杨丽华， 冯晨，徐梅珍，等，2019. 新分类系统下长蒴苣苔亚科 (苦苣苔科) 细胞学研究概述 [J]. 热带亚热带植物学报，27（5）：548-557.]

YANG N, TAN YX, LI QX, et al., 2012. Optimization of a chromosome mounting technique and karyotype analysis of *Thymus mongolicus*[J]. Acta Pratac Sin, 21(1): 184-189. [杨宁，谈永霞，李巧峡，等，2012.百 里香染色体制片优化及核型分析[J]. 草业学报，21(1)：184-189.]

YU Y, BLAIR C, HE X, 2020. RASP 4: ancestral state reconstruction tool for multiple genes and

characters[J]. Mol Biol Evol, 37(2): 604-606.
ZHAO DK, LU YX, SHI JF, et al., 2010. Seed germination and chromosome numbers of *Lysionotus pacuciforus* and *Briggsia longgipes*[J]. J Yunnan Agric Univ (Nat Sci Ed) , 25(2): 173-177. [赵大克，鲁元学，石景峰，等，2010. 吊石苣苔和盾叶粗筒苣苔的种子萌发及染色体数目观察[J]. 云南农业大学学报（自然科学版），25(2)：173-177.]
ZHAO Y, DU KH, LI WX, et al., 2019. Chromosome preparation optimization and karyotype analysis of two landscape plants in Araliaceae[J]. N Hortic, 22(1): 83-89. [赵雁，杜康华，李宛宣，等，2019. 两种五加科园林植物染色体制片优化与核型分析[J]. 北方园艺，22(1)：83-89.]